

令和 4 年 5 月 23 日現在

機関番号：12601

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2021

課題番号：20K16275

研究課題名（和文）関節リウマチ患者由来滑膜線維芽細胞を用いた新規治療標的の探索研究

研究課題名（英文）Exploratory research on novel therapeutic targets using synovial fibroblasts derived from patients with rheumatoid arthritis

研究代表者

土屋 遥香 (Tsuchiya, Haruka)

東京大学・医学部附属病院・特任講師

研究者番号：50868560

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では、関節リウマチ（RA）患者由来滑膜線維芽細胞（SFs）を用いたin vitro解析により、MTF-1活性阻害剤が、SFsにおける炎症性メディエーター（IL-6・CCL5）発現を抑制することを明らかにした。さらに、関節炎モデルマウス（collagen-induced arthritis: CIA）を用いたin vivo解析により、MTF-1阻害剤には、関節炎の進展抑制作用があることを示した。これらの結果は、MTF-1の活性阻害が、SFs由来の炎症性メディエーター発現の修飾を介して、関節炎を制御する可能性を示唆している。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、MTF-1のSFsにおけるin vitroおよびin vivoの機能解析を通じて、この転写因子の活性阻害がSFsからの炎症性メディエーターの発現を修飾し、動物モデルにおける関節炎を制御することを明らかにした。本研究により、炎症や骨軟骨破壊を引き起こすSFsを標的とした創薬候補が発見されたことで、既存の薬剤とは全く異なる経路を介した、より全身的な免疫抑制作用の少ない治療開発につながることを期待される。

研究成果の概要（英文）：We performed in vitro analysis using primary synovial fibroblasts (SFs) derived from patients with rheumatoid arthritis (RA), and revealed that the MTF-1 inhibitor suppresses the expression of inflammatory mediators (i.e., IL-6, CCL5) from activated SFs. In addition, an in vivo analysis using the collagen-induced arthritis (CIA) model demonstrated that the MTF-1 inhibitor had the effect of suppressing the progression of arthritis. These results suggest that inhibition of MTF-1 activity could regulate arthritis by modifying the production of inflammatory mediators derived from SFs.

研究分野：免疫学

キーワード：関節リウマチ 滑膜線維芽細胞 MTF-1

## 1. 研究開始当初の背景

関節リウマチ (rheumatoid arthritis; RA)は、持続的な滑膜炎が機能障害につながる関節破壊をもたらす自己免疫疾患である (Nat Rev Rheumatol 15, 9-17.)。近年、RA 治療は、関節内の炎症性サイトカイン (例: TNF- $\alpha$ ・IL-6)や B 細胞上の CD20・抗原提示細胞上の CD80/86 に結合する biological DMARDs (bDMARDs)、Janus kinase (JAK)に代表される特定のシグナル伝達経路を阻害する targeted synthetic DMARDs (tsDMARDs)が登場し、大きなパラダイムシフトを遂げた。しかし、このような新規治療をもってしても、臨床的寛解を達成した患者は約 30-40 %にとどまる (Nat Rev Dis Primers 4, 18001.)。また、臨床的寛解に至った患者においても、全身的な免疫抑制による重篤な感染の合併や治療の漸減・中止による関節炎の再燃は、臨床的問題として残存しており、これらの unmet needs に主眼をおいた新規治療標的の探索が求められている。

滑膜線維芽細胞 (synovial fibroblasts; SFs)は、関節滑膜に存在する多機能な間葉系細胞である。正常滑膜では、SFs は基質蛋白 (コラーゲンやフィブロネクチン)を産生することで可動関節の滑動性を維持する (Nat Rev Dis Primers 4, 18001.)。一方、RA の炎症滑膜では、病的形質を獲得した SFs が様々な免疫調節因子や接着分子・基質分解酵素を発現し、関節局所における炎症の惹起と持続に寄与する。即ち、「炎症局所」に局在するエフェクター細胞である SFs の病的形質を制御することは、既存の治療と比較し、より安全性の高い治療ストラテジーとなり得ると考えられる。また、SFs の病的形質は、関節内の複数のサイトカインに同時に曝露することで形成されると考えられる。関節内の複合的な炎症環境 (cytokine synergy)下で特異的に SFs に発現し、RA の病態に重要な遺伝子の発現を制御する転写調節因子を同定できれば、より有効な新規治療標的となる可能性がある。

## 2. 研究の目的

本研究の目的は、関節内の複合的な炎症環境 (cytokine synergy)下で誘導され、SFs の病的形質の形成を担う転写調節因子の機能解析を通じて、SFs を標的とした、より安全で有効な治療戦略の基盤を展開することにある。

申請者らは、本研究の開始までに、RA および変形性関節症患者 (計 60 例)由来の SFs を用いて、関節内の主要なサイトカイン刺激 (IFN- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6/sIL-6R, IL-17, TGF- $\beta$ 1, IL-18, 8-mix [関節内の複合的な炎症環境を模した上記 8 種類のサイトカインの mixture])下におけるゲノム・エピゲノム・トランスクリプトームの統合的解析を行い、synergistic な炎症環境下における SFs が RA の疾患発症の一部を担い、この際もたらされるダイナミックなクロマチン 3D 構造の変化を伴うエンハンサー構造のリモデリング (super-enhancers; SEs の形成)が、SFs からの炎症性サイトカイン (例: IL-6)やケモカイン (例: CCL5)の高度な発現と関連することを明らかにした。

また、synergistic な炎症環境下のエピゲノム構造を形成する候補転写因子を *in silico* で同定し、中でも MTF-1 および RUNX1 の siRNA ノックダウンにより、SEs により制御される遺伝子群の発現が mRNA レベルで抑制されることを発見し、これらが新規治療標的として有望であることを見出した。

## 3. 研究の方法

本研究では、複合的な炎症環境 (cytokine synergy)下における SFs のエピゲノム構造を担う候補転写因子 (MTF-1・RUNX1)のうち、siRNA ノックダウンの結果から、typical enhancers (TEs)と比較し SEs 形成に対する特異性が特に高いと考えられた MTF-1 に着目した。

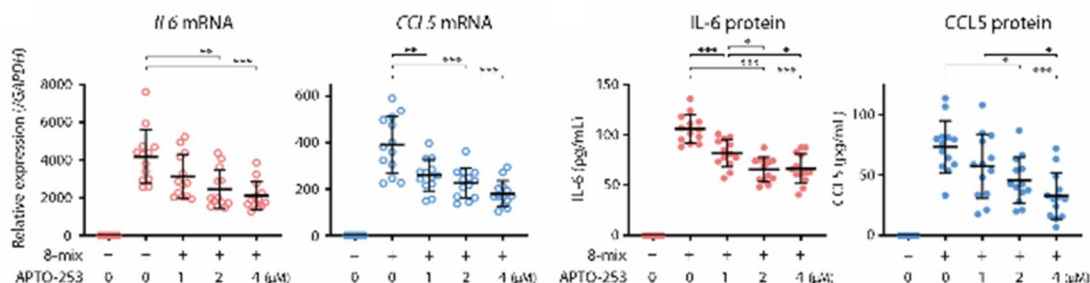
*In vitro* 解析: RA 患者由来 SFs を用いて、APTO-253 (MTF-1 活性阻害薬、CAS Registry Number 1422731-37-0)による病態関連遺伝子の mRNA および蛋白発現量の変化を評価した。具体的には、APTO-253 (1 - 4  $\mu$ g/mL)を添加した RA 患者由来 SFs を、関節内の複合的な炎症環境を模した 8 種類のサイトカインの mixture (IFN- $\alpha$ 、IFN- $\gamma$ 、TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ 、IL-6/sIL-6R、IL-17、TGF- $\beta$ 1、IL-18)で刺激した。細胞から total RNA を抽出、cDNA 合成し、IL6 および CCL5 の mRNA 発現を RT-PCR で評価した。また、これらの培養上清を用いた ELISA により、IL-6 と CCL5 の蛋白は発現を定量した。

*In vivo* 解析: APTO-253 を用いて Collagen Induced Arthritis (CIA)の誘導実験を行い、低分子化合物を用いた MTF-1 活性阻害による関節炎制御と、SFs 以外の免疫細胞 (主にリンパ球)への影響を評価した。具体的には、bovine type II collagen による 2 回目の免疫と同時に APTO-253 (15 mg/kg)の静脈注射 (週 2 回、2 週間)を開始する予防実験と、関節炎発症後に APTO-253 を投与する治療実験を行った。予防実験および治療実験において、関節炎の重症度は、

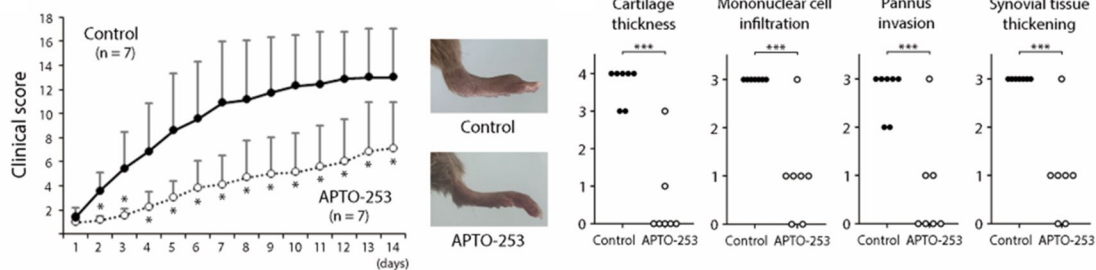
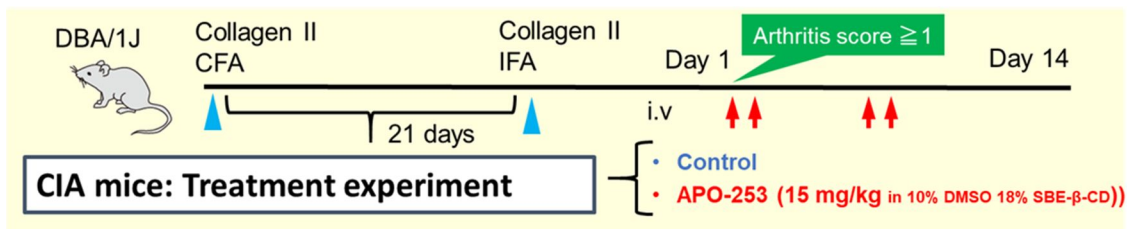
連日の関節炎スコア評価により定量し、治療実験では、関節破壊を病理学的に評価した。また、脾細胞の免疫細胞分画を、フローサイトメトリーにより解析した。

#### 4. 研究成果

APTO-253 は濃度依存性に、RA 患者由来 SFs における炎症性メディエーター( IL-6・CCL5 ) の mRNA および蛋白発現を抑制した。



APTO-253 は、関節炎の発症および、発症後の関節炎の進行を抑制した。また、治療実験では病理学的評価を加え、滑膜内への炎症細胞浸潤や骨軟骨破壊が抑制されることを確認した。尚、脾細胞の免疫細胞分画は、APTO-253 群と Control 群で有意差がなかった。すなわち、MTF-1 の活性阻害が、SFs 由来の炎症性メディエーター発現の修飾を介して、関節炎を制御する可能性が示唆された。



これらの結果は、ヨーロッパリウマチ学会誌 (Ann Rheum Dis. 2020 Nov 2;annrheumdis-2020-218189.)に論文発表した。

その後、SFs 特異的な MTF-1 の機能解明を目的に、更なる *in vivo* 検証実験を進めている。SFs 特異的な Cre 発現マウスと MTF-1 floxed マウスの交配により得られたマウス (Col6-cre MTF-1 knockout mouse)を用いて、滑膜組織のシングルセル解析など多角的な評価を行うことで、関節炎形成に対する MTF-1 の寄与メカニズムの解明を試みている。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Tsuchiya Haruka, Ota Mineto, Sumitomo Shuji, Ishigaki Kazuyoshi, Suzuki Akari, Sakata Toyonori, Tsuchida Yumi, Inui Hiroshi, Hirose Jun, Kochi Yuta, Kadono Yuho, Shirahige Katsuhiko, Tanaka Sakae, Yamamoto Kazuhiko, Fujio Keishi	4. 巻 80
2. 論文標題 Parsing multiomics landscape of activated synovial fibroblasts highlights drug targets linked to genetic risk of rheumatoid arthritis	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Annals of the Rheumatic Diseases	6. 最初と最後の頁 440 ~ 450
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1136/annrheumdis-2020-218189	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Tsuchiya Haruka, Ota Mineto, Fujio Keishi	4. 巻 41
2. 論文標題 Multiomics landscape of synovial fibroblasts in rheumatoid arthritis	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Inflammation and Regeneration	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1186/s41232-021-00157-8	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 （ローマ字氏名） （研究者番号）	所属研究機関・部局・職 （機関番号）	備考
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------